

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 560 098**

51 Int. Cl.:

G01N 15/02 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
G01N 15/00 (2006.01)
G01N 33/49 (2006.01)
G01N 15/14 (2006.01)
G01N 33/80 (2006.01)
G01N 33/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.03.2009 E 09722141 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.01.2016 EP 2271937**

54 Título: **Método y aparato para detectar y contar plaquetas individualmente y en agregados**

30 Prioridad:

21.03.2008 US 38554 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

17.02.2016

73 Titular/es:

ABBOTT POINT OF CARE, INC. (100.0%)
400 College Road East
Princeton, NJ 08540, US

72 Inventor/es:

WARDLAW, STEPHEN C.;
LEVINE, ROBERT A. y
LALPURIA, NITEN V.

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 560 098 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método y aparato para detectar y contar plaquetas individualmente y en agregados

5 Antecedentes de la invención

1. Campo técnico

10 La presente invención se refiere a un aparato y métodos para el análisis de muestras de sangre en general, y un aparato y métodos para detectar y enumerar plaquetas, y diferenciar plaquetas de plaquetas gigantes, y plaquetas gigantes de agregados plaquetarios, en particular.

2. Información antecedente

15 Los médicos, veterinarios y científicos han examinado los fluidos biológicos del ser humano y de animales, especialmente la sangre, para determinar las cantidades de constituyentes así como para identificar la presencia de partículas inusuales que no se observan en sujetos sanos. Los constituyentes medidos, cuantificados e identificados generalmente incluyen eritrocitos (RBC), leucocitos (WBC) y plaquetas.

20 En mamíferos, las plaquetas (también denominadas trombocitos) son pequeños fragmentos celulares anucleares de forma irregular que se derivan de la fragmentación de megacariocitos. Los trombocitos en ciertos animales (por ejemplo, aves, reptiles y peces) son de función similar a las plaquetas de mamíferos, pero son aproximadamente diez veces más grandes y nucleados. Los análisis de plaquetas pueden incluir determinaciones del número, el tamaño, la forma, la textura y el volumen de las plaquetas dentro de la muestra, incluyendo la determinación de la presencia de agregados de plaquetas o trombocitos dentro de la muestra. En ciertas condiciones que se dan en la naturaleza, las plaquetas se agregarán en agregados dentro de un sujeto como una respuesta útil a un traumatismo (por ejemplo, hemorragia, traumatismo tisular, etc.) experimentado por el cuerpo. Los agregados plaquetarios que se forman dentro de una muestra de sangre recogida para análisis, por otro lado, típicamente no son útiles y pueden obstaculizar el análisis de la muestra de sangre. Pueden usarse anticoagulantes (por ejemplo, EDTA) para impedir que las plaquetas se agreguen dentro de una muestra, pero los agregados se pueden seguir formando si existe un retardo en la mezcla del anticoagulante con la muestra de sangre. Una vez que se forman los agregados, los anticoagulantes son típicamente ineficaces para separarlos en plaquetas individuales. Los agregados plaquetarios son, a menudo, problemáticos dentro de una muestra que está siendo analizada, dado que pueden causar recuentos plaquetarios erróneamente bajos, lo que puede causar diagnósticos erróneos y graves consecuencias para el paciente.

35 Las técnicas de examen hematológico conocidas, descritas en detalle en textos tales como Wintrobe's Clinical Hematology 12^a Edición, generalmente dividen los métodos de examen en métodos de tipo manual, centrífugo y de impedancia. Los métodos manuales típicamente implican la creación de un volumen determinado con exactitud de una muestra de sangre o fluido que se diluye cuantitativamente y se cuenta visualmente en una cámara de recuento. Los métodos de examen manuales para enumeración de células incluyen examinar un frotis periférico donde las cantidades relativas de los tipos de partícula se determinan mediante inspección visual. Los métodos de examen centrífugo implican centrifugar la muestra, haciendo que la muestra se separe en capas constituyentes de acuerdo con las densidades relativas de los constituyentes. Las capas componentes pueden teñirse para mejorar la visibilidad o la detección. Los métodos de impedancia implican el examen de un volumen exacto de sangre que es tratada de acuerdo con la partícula que es medida; por ejemplo, lisando RBC para enumeración de las células nucleadas y diluyendo volumétricamente la muestra en un fluido conductor. El proceso típicamente implica monitorizar una corriente o tensión aplicada a la muestra que pasa a través de un estrecho pasaje para determinar el efecto que tienen las partículas sobre la corriente/tensión a medida que las partículas pasan a través en fila india. Otras técnicas implican analizar la intensidad y el ángulo de dispersión de la luz incidente en partículas que pasan en fila india a través de un haz de luz. También pueden usarse métodos de citometría de flujo que implican teñir partículas de interés en suspensión con fluoróforos unidos a anticuerpos dirigidos contra epítomos superficiales presentes en tipos de células o de partículas, excitar las partículas teñidas con luz de longitudes de onda apropiadas, y analizar la emisión de las partículas/células individuales. Un ejemplo de un método de tipo flujo es el documento WO-98/02727, que describe un método y un aparato para realizar análisis automatizados.

60 Todos los métodos mencionados anteriormente, aparte del frotis periférico o la separación centrífuga, requieren dispensar un volumen de muestra preciso. Las inexactitudes en el volumen de muestra darán como resultado errores cuantitativos de la misma magnitud en el análisis asociado. Con la excepción de los métodos centrífugos, todos los métodos mencionados anteriormente también requieren que la muestra se mezcle con uno o más reactivos o diluyentes líquidos, y también requieren la calibración del instrumento para obtener resultados exactos. En el caso de frotis periféricos, se necesita un alto grado de formación para examinar apropiadamente el frotis. Una serie de los métodos mencionados anteriormente generan grandes volúmenes de desechos contaminados que son caros de manipular. Adicionalmente, los métodos descritos anteriormente no son adecuados para determinar el hemograma completo (CBC) en aves, reptiles y peces, donde los eritrocitos y trombocitos son nucleados, y en ciertos mamíferos donde el tamaño de los eritrocitos es muy pequeño y estos pueden confundirse con plaquetas.

Sumario de la invención

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un método para enumerar plaquetas dentro de una muestra de sangre sustancialmente sin diluir. El método incluye las etapas de: 1) depositar la muestra en una cámara de análisis adaptada para contener de forma quiescente la muestra para análisis, la cámara definida por un primer panel y un segundo panel, paneles que son, ambos, transparentes; 2) mezclar un colorante con la muestra, colorante que es operativo para hacer que las plaquetas emitan fluorescencia tras la exposición a una o más primeras longitudes de onda de luz predeterminadas; 3) iluminar al menos una parte de la muestra que contiene las plaquetas a las primeras longitudes de onda; 4) obtener imágenes de la al menos una parte de la muestra, incluyendo producir señales de imagen indicativas de emisiones fluorescentes desde las plaquetas, emisiones fluorescentes que tienen una intensidad; 5) identificar las plaquetas por sus emisiones fluorescentes, usando las señales de imagen; 6) determinar un valor promedio de intensidad de emisión fluorescente para las plaquetas individuales identificadas dentro de la al menos una parte de la muestra; 7) identificar agregados de plaquetas dentro de la al menos una parte de la muestra usando una o más de sus emisiones fluorescentes, área, forma y granularidad; y 8) enumerar plaquetas dentro de cada agregado plaquetario usando el valor promedio de intensidad de emisión fluorescente determinado para las plaquetas individuales dentro de la muestra.

En un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un aparato para iluminar plaquetas dentro de una muestra de sangre, de acuerdo con la reivindicación 14.

Una ventaja de la presente invención es que proporciona un recuento plaquetario exacto dentro de una muestra de sangre. La mayoría de los analizadores hematológicos de la técnica anterior cuentan el número de plaquetas dentro de la muestra suponiendo que los constituyentes dentro de la muestra de cierto tamaño son, de hecho, plaquetas. Las plaquetas gigantes y los agregados plaquetarios, ambos de los cuales son mayores que las plaquetas de tamaño normal, pueden, por lo tanto, no ser considerados en el recuento y pueden contarse como leucocitos. El recuento plaquetario bajo resultante puede interpretarse erróneamente como trombocitopenia. La presente invención identifica plaquetas gigantes y agregados plaquetarios y enumera las plaquetas dentro de los agregados plaquetarios. Como resultado, se proporciona un recuento plaquetario que es más exacto que el proporcionado por la mayoría de los analizadores hematológicos automatizados de la técnica anterior y uno que evita contar las plaquetas gigantes y los agregados plaquetarios como leucocitos, lo que da como resultado recuentos plaquetarios falsamente bajos y recuentos de leucocitos falsamente altos.

Otra ventaja de la presente invención es que permite la identificación y enumeración de plaquetas gigantes dentro de una muestra de sangre.

Otra ventaja de la presente invención es que puede usarse para determinar características de una muestra de sangre usando un volumen de muestra extremadamente pequeño que puede obtenerse directamente del paciente mediante punción capilar haciéndola más útil para aplicaciones en centro asistencial o a partir de una muestra venosa, si se desea.

Otra ventaja del presente método es que opera libre de fluidica externa e interna, e independiente de la gravedad o la orientación y, por lo tanto, es adaptable para uso en un dispositivo portátil o de mano en condiciones de microgravedad.

El presente método y las ventajas asociadas con él se volverán más fácilmente evidentes en vista de la descripción detallada proporcionada a continuación, incluyendo los dibujos adjuntos.

Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1-4 son representaciones esquemáticas de sección transversal de cámaras de análisis que pueden usarse en el presente método.

La figura 5 es una vista en planta esquemática de una cinta que tiene una pluralidad de cámaras de análisis.

La figura 6 es una vista en planta esquemática de un recipiente desechable que tiene una cámara de análisis.

La figura 7 es una vista de sección transversal esquemática de un recipiente desechable que tiene una cámara de análisis.

La figura 8 es un esquema esquemático de un dispositivo de análisis que puede usarse con el presente método.

La figura 9 es una imagen en color de una parte de una cámara que contiene una muestra de sangre sustancialmente sin diluir mezclada con un tinte de naranja de acridina fluorescente, que ha sido iluminada a una longitud de onda que produce emisiones fluorescentes a partir de los constituyentes (por ejemplo, WBC, plaquetas, etc.) que han absorbido el tinte, imagen obtenida a una primera amplificación de intensidad.

La figura 10 es la imagen en color mostrada en la figura 9, imagen obtenida a una segunda amplificación de intensidad que es mayor que la primera.

La figura 11 es una imagen en color de una parte de una cámara que contiene una muestra de sangre sustancialmente sin diluir mezclada con un tinte de naranja de acridina fluorescente, que ha sido iluminada a una longitud de onda que produce emisiones fluorescentes a partir de los constituyentes, ilustrando los diferentes perfiles de emisión de WBC, agregados plaquetarios y plaquetas.

La figura 12 es una imagen en color de una parte de una cámara que contiene una muestra de sangre sustancialmente sin diluir mezclada con un tinte de naranja de acridina fluorescente, que ha sido iluminada a una longitud de onda que produce emisiones fluorescentes a partir de los constituyentes, ilustrando los diferentes perfiles de emisión de plaquetas, plaquetas gigantes y reticulocitos.

La figura 13 es una imagen en color de una parte de una cámara que contiene una muestra de sangre sustancialmente sin diluir mezclada con un tinte de naranja de acridina fluorescente, que ha sido iluminada a una longitud de onda que produce emisiones fluorescentes a partir de los constituyentes, ilustrando los diferentes perfiles de emisión de plaquetas y reticulocitos. La imagen también incluye WBC editados a partir de la imagen, y RBC observados vagamente en el fondo.

La figura 14 es una versión en blanco y negro de la imagen mostrada en la figura 13 que se crea iluminando la muestra a una longitud de onda que muestra los valores de densidad óptica de la imagen. Esta imagen ilustra los perfiles de densidad óptica de reticulocitos y RBC dentro de la muestra, perfiles que permiten que los reticulocitos sean identificados.

La figura 15 es un diagrama de bloques de las etapas de un método de acuerdo con un aspecto de la presente invención.

Descripción detallada de realizaciones de la invención

El presente método generalmente utiliza una cámara de análisis que es accionable para contener de forma quiescente una muestra de sangre completa anticoagulada sustancialmente sin diluir para análisis. La cámara está típicamente dimensionada para contener aproximadamente de 0,2 a 1,0 μ l de muestra, pero la cámara no está limitada a ninguna capacidad de volumen particular, y la capacidad puede variar para adecuarse a la aplicación de análisis. La frase "sustancialmente sin diluir", tal como se usa en el presente documento, describe una muestra de sangre que no está diluida en absoluto o no ha sido diluida intencionadamente, pero a la que se le han añadido algunos reactivos para fines del análisis. En la medida en que la adición de los reactivos diluye la muestra, si es que lo hace, dicha dilución no tiene ningún impacto clínicamente significativo sobre el análisis realizado. Típicamente, los únicos reactivos que se usarán en la ejecución del presente método son anticoagulantes (por ejemplo, EDTA, heparina) y colorantes. Estos reactivos se añaden generalmente en forma seca y no pretenden diluir la muestra. En ciertas circunstancias (por ejemplo, análisis muy rápido - tal como puede ocurrir cuando la sangre se toma a partir de punción en el dedo de un paciente o punción en el talón de un recién nacido), puede no ser necesario añadir el agente anticoagulante, pero es preferible hacerlo en la mayoría de los casos para garantizar que la muestra está en una forma aceptable para análisis. El término "quiescente" se usa para describir que la muestra se deposita dentro de la cámara para análisis, y no se mueve intencionadamente con respecto a la cámara durante el análisis. En la medida en que el movimiento está presente dentro de la muestra de sangre, éste será de forma predominante el debido al movimiento Browniano de los constituyentes formados de la muestra de sangre, movimiento que no es incapacitante del uso del dispositivo de esta invención.

El colorante (por ejemplo, un tinte, tinción, etc.), que se mezcla con al menos una parte de la muestra de sangre, facilita la identificación y el análisis cuantitativo de los constituyentes (por ejemplo, plaquetas, WBC, etc.) que absorben el colorante. El colorante emite fluorescencia a lo largo de longitudes de onda características (por ejemplo, 530 nm, 585 nm y 660 nm) cuando es excitado por la luz a lo largo de ciertas longitudes de onda (por ejemplo, aproximadamente 470 nm). Las longitudes de onda específicas a las que un constituyente emitirá fluorescencia son una característica de ese constituyente y la longitud de onda o longitudes de onda de la luz de excitación. En algunas realizaciones, el colorante también puede absorber luz a una o más longitudes de onda predeterminadas en función de la concentración del colorante dentro del constituyente. Los ejemplos de colorantes aceptables incluyen los tintes supravitales naranja de acridina y "naranja astrozone". La invención no está limitada a tintes supravitales. Sin embargo. Un experto en la materia conocería intervalos de concentración de colorantes apropiados, o podría determinarlos sin experimentación excesiva.

Con referencia ahora a la figura 1, la cámara de análisis 10 está definida por un primer panel 12 que tiene una superficie interior 14, y un segundo panel 16 que tiene una superficie interior 18. Los paneles 12, 16 son ambos suficientemente transparentes para permitir la transmisión de luz a lo largo de longitudes de onda predeterminadas a su través en una cantidad suficiente para realizar el análisis de la densidad óptica descrito a continuación. Al menos una parte de los paneles 12, 16 son paralelas entre sí, y dentro de esa parte las superficies interiores 14, 18 están

separadas entre sí por una altura 20, altura que puede ser conocida o medible. Los RBC 22 se muestran dispuestos dentro de la cámara 10.

El presente método puede utilizar diversos tipos de cámaras de análisis diferentes que tienen las características mencionadas anteriormente, y no está limitado, por lo tanto, a ningún tipo particular de cámara de análisis. Una cámara de análisis que tiene paneles paralelos 12, 16 simplifica el análisis y es, por lo tanto, preferida, pero no es requerida para la presente invención; por ejemplo, podría usarse una cámara que tiene un panel dispuesto en un ángulo no paralelo conocido con respecto al otro panel.

Con referencia ahora a las figuras 2-5, se muestra un ejemplo de una cámara aceptable 10 que incluye un primer panel 12, un segundo panel 16, y al menos tres separadores 26 dispuestos entre los paneles 12, 16. Los separadores 26 pueden ser cualquier estructura que puede disponerse entre los paneles 12, 16, accionable para alejar los paneles 12, 16 entre sí. La dimensión 28 de un separador 26 que se extiende entre los paneles 12, 16 se denomina en el presente documento como la altura 28 del separador 26. Las alturas 28 de los separadores 26 típicamente no son exactamente iguales entre sí (por ejemplo, tolerancias de fabricación), pero están dentro de la tolerancia aceptable comercialmente para medios de separación usados en aparatos de análisis similares. Perlas esféricas son un ejemplo de un separador aceptable 26 y están disponibles en el mercado de, por ejemplo, Bangs Laboratories de Fishers, Indiana, EE. UU.

En la realización de cámara mostrada en la figura 3, los separadores 26 constan de un material que tiene mayor flexibilidad que uno o ambos del primer panel 12 y el segundo panel 16. Tal como puede verse en la figura 3, los separadores más grandes 26 son comprimidos hasta el punto en el que la mayoría de los separadores 26 están tocando las superficies interiores de los paneles 12, 16, haciendo de este modo la altura de la cámara justamente ligeramente menor que los diámetros del separador medio 26. En la realización de la cámara mostrada en la figura 4, los separadores 26 constan de un material que tiene menos flexibilidad que uno o ambos del primer panel 12 y el segundo panel 16. En la figura 4, el primer panel 12 está formado a partir de un material más flexible que los separadores esféricos 26 y el segundo panel 16, y recubrirá los separadores 26 a la manera de una tienda. En esta realización, aunque pequeñas regiones locales de la cámara 10 pueden desviarse de la altura de cámara deseada 20, la altura promedio 20 de la cámara 10 será muy cercana a la del diámetro del separador medio 26. El análisis indica que la altura media de la cámara 20 puede estar controlada al uno por ciento (1 %) o mejor a alturas de la cámara de menos de cuatro micrómetros usando esta realización. Sujetos a las características de flexibilidad descritas anteriormente (así como otros factores tales como la densidad de distribución de los separadores), los separadores 26 y los paneles 12, 16 pueden estar hechos de diversos materiales, siempre que los paneles 12, 16 sean suficientemente transparentes. Películas de plástico transparentes que constan de polietilenteraftalato son un ejemplo de paneles aceptables 12, 16, y perlas esféricas hechas de poliestireno, policarbonato, silicona, y similares, son separadores aceptables 26. Un ejemplo específico de un separador aceptable son esferas hechas de poliestireno que están disponibles en el mercado, por ejemplo, de Thermo Scientific de Fremont, California, EE. UU., n.º de catálogo 4204A, de cuatro micrómetros (4 μm) de diámetro. Con referencia a la figura 5, el panel 12 que se va a disponer verticalmente por encima del otro incluye una pluralidad de orificios 30 dispuestos a intervalos regulares (por ejemplo, que actúan como respiraderos de aire), y los paneles 12, 16 se unen entre sí en puntos. En algunas realizaciones, el material de unión 32 forma una pared de cámara externa accionable para contener lateralmente la muestra 34 dentro de la cámara de análisis 10. Este ejemplo de una cámara de análisis aceptable se describe con más detalle en las publicaciones de solicitud de patente estadounidense n.º 2007/0243117, 2007/0087442 y las solicitudes de patente provisional estadounidense número 61/041.783, presentada el 2 de abril de 2008; y 61/110.341, presentada el 31 de octubre de 2008.

Otro ejemplo de una cámara aceptable 10 está dispuesta en un recipiente desechable 36, tal como se muestra en las figuras 6 y 7. La cámara 10 está formada entre un primer panel 12 y un segundo panel 16. Tanto el primer panel 12 como el segundo panel 16 son transparentes para permitir a la luz pasar a través de la cámara 10. Al menos una parte del primer panel 12 y el segundo panel 16 son paralelas entre sí, y dentro de esa parte las superficies interiores 14, 18 están separadas entre sí por una altura 20. Esta realización de cámara 10 se describe con más detalle en la patente de Estados Unidos n.º 6.723.290. Las cámaras de análisis mostradas en las figuras 2-7, representan cámaras que son aceptables para uso en el presente método. El presente método no está, sin embargo, limitado a estas realizaciones particulares.

No es necesario conocer la altura exacta de la cámara para fines de la presente divulgación. Una altura de la cámara de aproximadamente dos a seis micrómetros (2-6 μm) es aceptable para la mayoría de especies animales en base a tamaños de célula típicos. Una altura de la cámara 20 de aproximadamente tres a cinco micrómetros (3-5 μm) es particularmente muy adecuada para analizar sangre humana. La presente invención no está, sin embargo, limitada a ninguna altura de la cámara particular, siempre que la metodología descrita en el presente documento pueda conseguirse con dicha altura de la cámara.

El análisis de la muestra dispuesta de forma quiescente dentro de la cámara 10 se realiza usando un dispositivo de análisis que es accionable para iluminar y obtener imágenes de al menos una parte de la muestra y realizar un análisis de la imagen. La imagen se produce de una manera que permite emisiones fluorescentes desde, y la densidad óptica de, la parte de la muestra a determinar por unidad. La expresión "por unidad" o "unidad de imagen"

significa una unidad creciente definida a partir de la cual la imagen de la muestra puede diseccionarse. Un píxel, que generalmente se define como el elemento más pequeño de una imagen que puede procesarse individualmente dentro de un sistema de imaginología particular, es un ejemplo de una unidad de imagen, y una unidad de imagen puede incluir un pequeño número de píxeles en una unidad colectiva. El aumento de un dispositivo de imaginología también puede describirse en términos lineales (por ejemplo, micrómetros por píxel en el plano focal), donde la dimensión lineal es a lo largo de un eje particular de una rejilla ortogonal aplicada a la imagen. El área real de la muestra capturada mediante píxeles del sensor en el plano focal está, por lo tanto, en función del factor de aumento aplicado por el dispositivo de imaginología. Por lo tanto, es útil pero no necesario conocer el aumento del dispositivo de imaginología. El volumen asociado con ese píxel es, por lo tanto, el área de la imagen por píxel veces la altura de la cámara. Por ejemplo, si el aumento era 0,5 micrómetros por píxel, una imagen que ocupe 200 píxeles tendría un área de 50 micrómetros cuadrados, y un volumen de 50 micrómetros cuadrados veces la altura de la cámara.

Con referencia ahora a la figura 8, un ejemplo de un dispositivo de análisis 54 que puede adaptarse para uso con el presente método incluye un iluminador de muestras 56, un disector de imágenes 58, y un analizador programable 50. El iluminador de muestras 56 incluye una fuente de luz que produce selectivamente luz a lo largo de ciertas longitudes de onda deseadas. Por ejemplo, pueden usarse LED que emiten las longitudes de onda deseadas (por ejemplo, 420 nm, 440 nm, 470 nm, etc.). Como alternativa, puede usarse una fuente de luz que produce un intervalo de longitud de onda ancho (por ejemplo, aproximadamente 400 - 670 nm), aunque en algunos casos dicha fuente de luz puede requerir filtración. El dispositivo de análisis 54 puede incluir componentes ópticos para manipular la luz. El iluminador de muestras 56 incluye una fuente de luz de transmitancia y una fuente de luz de epi-iluminación, cada una accionable para iluminar parte, o toda, de la muestra que reside dentro de la cámara 10. Un ejemplo de un disector de imágenes aceptable 58 es un sensor de imágenes de tipo dispositivo de carga acoplada (CCD) que convierte una imagen de la luz que pasa a través de la muestra en un formato de datos electrónicos (es decir, una señal). Los sensores de imágenes de tipo semiconductor complementario de óxido metálico ("CMOS") son otro ejemplo de un sensor de imágenes que puede usarse, y la presente invención no está limitada a ninguno de estos ejemplos. El analizador programable 50 incluye una unidad central de procesamiento (CPU) y está conectado al iluminador de muestras 56 y al disector de imágenes 58. La CPU está adaptada (por ejemplo, programada) para realizar selectivamente las funciones necesarias para realizar el presente método. Debe observarse que la funcionalidad del analizador programable 50 puede implementarse usando hardware, software, firmware, o una combinación de los mismos. Un experto en la materia sería capaz de programar la unidad de procesamiento para realizar la funcionalidad descrita en el presente documento sin experimentación excesiva. La patente de Estados Unidos n.º 6.866.823 titulada "Apparatus for Analyzing Biologic Fluids" y expedida el 15 de marzo de 2005, desvela dicho dispositivo de análisis 44.

El dispositivo de análisis está adaptado para procesar las señales de imagen creadas a partir de la iluminación de al menos una parte de la muestra a identificar y enumerar constituyentes dentro de la muestra. Las señales de imagen incluyen emisiones fluorescentes y valores de densidad óptica por píxel. La intensidad y el color de las emisiones y la densidad óptica por píxel establecen colectivamente la imagen de la parte de muestra iluminada. Dentro de la imagen colectiva, el dispositivo de análisis está adaptado para identificar un perfil de constituyentes seleccionados, usando uno o más de la intensidad fluorescente, el contenido de color y la densidad óptica de las emisiones fluorescentes y, en algunos casos, características físicas (por ejemplo, área, geometría del borde, etc.) de los constituyentes. El dispositivo de análisis usa los perfiles de imagen para distinguir entre los constituyentes seleccionados hasta que los constituyentes restantes representan los constituyentes diana (por ejemplo, plaquetas), punto en el cual los constituyentes diana pueden enumerarse.

Según el presente método, una muestra de sangre completa sustancialmente sin diluir se introduce en una cámara 10, y seguidamente reside de forma quiescente dentro de la cámara 10. Un agente anticoagulante y un colorante se mezclan con la muestra antes de su introducción en la cámara o tras la introducción en la cámara. El colorante es absorbido por los constituyentes (por ejemplo, WBC, plaquetas, reticulocitos) dentro de la muestra. En algunas aplicaciones, se añade un agente esferizante isovolumétrico a la muestra para hacer que algunos o todos los RBC dentro de la muestra asuman una forma similar a la esférica. Un ejemplo de un agente esferizante isovolumétrico aceptable es un detergente zwitteriónico. Un ejemplo específico de un agente esferizante es el detergente Zwittergent® 3-16, que es un detergente zwitteriónico producido por Calbiochem, una empresa de EMD Chemicals, Inc. de Nueva Jersey, EE. UU. La cantidad de agente esferizante añadida a la muestra es una cantidad adecuada para esferizar al menos un número de RBC requerido para realizar el presente análisis de hematocrito. La cantidad específica dependerá del agente particular y las circunstancias del análisis, que pueden ser determinadas por un experto en la materia sin experimentación excesiva. La forma biconcava natural de los RBC, y el tamaño relativo de los RBC con respecto a las plaquetas, puede hacer que las plaquetas dentro de una muestra se "oculten" entre los RBC en la muestra; por ejemplo, dentro de las concavidades de un RBC. Esferizar los RBC disminuye la probabilidad de que las plaquetas estén ocultas dentro de una muestra entre los RBC e incrementa la probabilidad de que dichas plaquetas puedan verse como individuos dentro del plasma y, por lo tanto, incrementa la exactitud de los análisis cuantitativos de plaquetas realizados sobre la muestra.

Al menos una parte de la muestra que reside forma quiescente dentro de la cámara es iluminada por el dispositivo de análisis 54, que transmite la luz a través de la muestra. Aunque no es un requisito que se obtengan imágenes de toda la muestra que reside dentro de la cámara, es preferible, dado que hacerlo típicamente proporciona un análisis

más completo de la muestra y un incremento concomitante de la exactitud. La muestra se ilumina con longitudes de onda que se sabe que excitan una emisión fluorescente a partir de los constituyentes en relación con el colorante absorbido por los constituyentes. Los constituyentes teñidos con naranja de acridina producen una emisión fluorescente cuando son iluminados con luz violeta a una longitud de onda de aproximadamente 470 nm. Las fotografías mostradas en las figuras 9-13 ilustran las emisiones fluorescentes de los constituyentes (por ejemplo, plaquetas, plaquetas gigantes, WBC, reticulocitos, agregados plaquetarios) descubiertas dentro de la muestra. Las emisiones específicas dependen del colorante usado y la composición intracelular de la célula iluminada (por ejemplo, la interacción del colorante con el contenido de la célula o la plaqueta crea las emisiones). Algunos constituyentes presentan emisiones fluorescentes que actúan como un distintivo fluorimétrico (también denominada un “perfil”), distintivo que representa una relación particular de emisiones fluorescentes a lo largo de longitudes de onda que producen combinaciones de luz (por ejemplo, una relación de “rojo/verde” característica) que son relativamente únicas de ese constituyente y pueden usarse, por lo tanto, para identificar ese constituyente. Otros constituyentes presentan distintivos de emisión fluorescente que no pueden distinguirse fácilmente entre sí. Para distinguir esos constituyentes, la muestra es iluminada con longitudes de onda de luz que son absorbidas por la hemoglobina en cantidades apreciablemente mayores de lo que serían absorbidas por las plaquetas o el plasma. La cantidad de absorción puede medirse en términos de densidad óptica, y la densidad óptica, a su vez, puede usarse para distinguir constituyentes que contienen hemoglobina de aquellos que no la contienen.

Dado que la parte de emisión fluorescente de la imagen está en función de factores tales como el tipo de colorante usado y la concentración del colorante dentro de la muestra, es útil, aunque no es necesario, calibrar la muestra para intensidad. Por ejemplo, para una concentración dada de colorante, la emisión fluorescente procedente de WBC es de promedio mayor que la emisión fluorescente procedente de plaquetas. Esto puede verse claramente en las figuras 9 y 10, que son imágenes de la misma muestra. La amplificación de la emisión fluorescente en la figura 10 es mayor que la usada en la figura 9. La figura 9 muestra claramente las emisiones fluorescentes procedentes de los WBC 40, y muestra vagamente las emisiones procedentes de las plaquetas 42. La figura 10 muestra claramente tanto WBC 40 como plaquetas 42, y también muestra cómo cada una puede distinguirse por su intensidad de emisión fluorescente. La calibración identifica el nivel de intensidad asociado con los WBC y el nivel de intensidad asociado con las plaquetas para el dispositivo de análisis, y calibra el dispositivo de análisis en consecuencia.

Las emisiones fluorescentes y la luz transmitida producida iluminando la muestra se convierten en señales de imagen por píxel que establecen colectivamente la imagen de la parte de muestra iluminada. Dentro de la imagen colectiva, el dispositivo de análisis está adaptado para identificar un perfil de ciertos constituyentes seleccionados, usando uno o más de la intensidad fluorescente, el contenido de color y la densidad óptica de las emisiones fluorescentes. El proceso de identificar los perfiles de los constituyentes mediante características mencionadas anteriormente puede realizarse usando algoritmos que comparan las diversas características para identificar el constituyente. Una vez que se ha identificado el constituyente, puede analizarse adicionalmente. Por ejemplo, un número representativo de plaquetas pueden identificarse dentro de la muestra mediante su perfil de emisión fluorescente y analizarse colectivamente para determinar un promedio de la intensidad de emisión fluorescente para las plaquetas. En algunos casos, también se usan perfiles fluorescentes del constituyente para determinar las áreas internas y las regiones de borde de los constituyentes usando los perfiles de señal fluorescente. Las áreas de constituyentes individuales pueden promediarse para determinar un valor de área promedio. Los perfiles de borde pueden analizarse para suavidad y/o para geometría; por ejemplo, determinar si el borde de un constituyente es circular, no circular, irregular, etc. Estas características se usan posteriormente para distinguir constituyentes dentro de la muestra, hasta que los constituyentes restantes representan los constituyentes diana (por ejemplo, plaquetas), punto en el cual los constituyentes diana pueden enumerarse.

Para ilustrar un ejemplo de la presente invención, una muestra de sangre sustancialmente sin diluir se mezcla con EDTA, naranja de acridina, y un detergente zwitteriónico y se introduce dentro de una cámara que tiene dos paneles transparentes con el fin de determinar un recuento plaquetario dentro de la muestra. Los constituyentes, incluyendo RBC, reticulocitos, WBC, plaquetas, plaquetas gigantes y agregados plaquetarios, residen de forma quiescente dentro de la muestra. La muestra se ilumina a 470 nm, al menos una de 413 nm y 540 nm. La iluminación a 470 nm produce una emisión fluorescente procedente del naranja de acridina. Otros colorantes pueden emitir luz tras la iluminación a otras longitudes de onda. La iluminación a 413 nm y/o 540 nm se usa para indicar la presencia de hemoglobina mediante su densidad óptica, tal como se describirá a continuación. Se toman imágenes digitales de la muestra iluminada.

La imagen de la muestra se analiza para identificar diversos constituyentes dispuestos dentro de la muestra. Los WBC, por ejemplo, son identificados individualmente mediante una o más de su distintivo fluorescente (por ejemplo, patrón de emisión fluorescente que consta de una fluorescencia citoplasmática roja significativa y una fluorescencia nuclear verde), la intensidad relativa de sus emisiones fluorescentes, el área que ocupan y su forma (véase las figuras 9-11). Los WBC se distinguen, de este modo, del resto de la muestra; por ejemplo, filtrando la imagen, de modo que los WBC ya no se consideran dentro de la imagen.

Con referencia ahora a la figura 12, plaquetas gigantes 44 pueden identificarse dentro de la muestra mediante uno o más de su perfil fluorescente, su área y su forma. Los RBC 45 pueden verse vagamente en el fondo. La relación colorimétrica de una plaqueta gigante 44 es similar a la de una plaqueta normal 42, pero las emisiones son de mayor

intensidad debido a la mayor masa de la partícula. Las plaquetas gigantes 44 son también significativamente más grandes que las plaquetas normales 42 y de forma circular. Las plaquetas normales 42 son típicamente de forma irregular. La mayoría de las plaquetas de tamaño normal son de 1,5 a 3 μm de diámetro. Las plaquetas gigantes 44, en contraste, son mayores de 7 μm y habitualmente están en el intervalo de 10 μm a 20 μm de diámetro. La identificación y enumeración de plaquetas gigantes proporciona importante información clínica, dado que la presencia de plaquetas gigantes puede ser un indicador del síndrome de Bernard-Soulier y trastornos mieloproliferativos (por ejemplo, leucemia mielógena crónica (LMC), policitemia vera, trombocitopenia esencial (primaria), y metaplasia mieloide agnógena). Las plaquetas gigantes 44 dentro de la muestra se identifican comparando una o más de sus emisiones fluorescentes (colorimétrica e intensidad), su área, y la forma de perímetro contra valores de emisión fluorescente, el área y las formas del perímetro de plaquetas normales, incluyendo los valores promedio de intensidad y área de las plaquetas. Como ejemplo de criterios que pueden usarse para identificar plaquetas gigantes, el dispositivo de análisis puede estar programado con uno o más criterios comparativos con respecto a plaquetas normales (por ejemplo, un múltiplo del área o la intensidad promedio de las plaquetas en base a desviaciones típicas del área o la intensidad promedio de una plaqueta normal, o mediante un valor de área o intensidad predeterminado, etc.). Con respecto al área promedio de plaquetas, la distribución de áreas de plaquetas dentro de cualquier muestra dada se describe típicamente como una función logarítmica normal y puede determinarse estadísticamente usando técnicas conocidas. Las plaquetas gigantes identificadas se distinguen a continuación y, dependiendo de la información específica deseada, se incluyen en el recuento de plaquetas y/o se consideran como una población de constituyentes independiente.

Los reticulocitos 46 emiten un perfil fluorescente que es similar al de las plaquetas normales debido al material nuclear que contienen. La fotografía en la figura 13 muestra las emisiones fluorescentes de los reticulocitos 46 y las plaquetas 42. Las partes circulares oscurecidas son partes de la imagen donde se dispusieron WBC, pero cuya imagen fue enmascarada. Los reticulocitos 46 pueden distinguirse de las plaquetas 42 en cierta medida por su emisión fluorescente, que aparece ligeramente más brillante y tiene ligeramente más rojo. Los reticulocitos 46 también pueden distinguirse iluminando la muestra con luz a longitudes de onda de 413 nm y/o 540 nm, longitudes de onda que son absorbidas por la hemoglobina en una cantidad sustancialmente mayor que cualquier otro material presente dentro de la muestra y es, por lo tanto, indicativa de la presencia de hemoglobina. La absorción de luz de la hemoglobina puede cuantificarse en términos de densidad óptica. La figura 14 ilustra la DO de los reticulocitos. Los reticulocitos se distinguen del resto de la muestra usando uno o ambos de los patrones de emisión fluorescente y la DO.

En la mayoría de las muestras de sangre, los constituyentes con una emisión fluorescente que quedan después de que se han distinguido los WBC, las plaquetas gigantes y los reticulocitos son de forma predominante, si no completamente, plaquetas. Las plaquetas individuales dentro de la muestra pueden identificarse y enumerarse. En algunas muestras de sangre, sin embargo, una parte de las plaquetas dentro de la muestra pueden estar agregadas en uno o más agregados, agregados que pueden ser de tamaño muy grande; por ejemplo, de una a cuatro veces el tamaño de un WBC. La fotografía en la figura 11 muestra tanto agregados plaquetarios 48 como WBC 40. Los agregados plaquetarios 48 son identificables y distinguibles de otros constituyentes (por ejemplo, WBC 40, plaquetas gigantes 44) por su perfil de emisión fluorescente que tiene una relación rojo/verde que es distinguible de la de un WBC 40, por su granularidad, y en algunos casos por su área y/o forma. Por ejemplo, los agregados plaquetarios 48 son distinguibles de las plaquetas gigantes dado que los agregados plaquetarios son de forma irregular y las plaquetas gigantes son de forma sustancialmente circular. La relativa circularidad de tanto los agregados plaquetarios como las plaquetas gigantes puede determinarse mediante software de análisis de imágenes programado en el dispositivo de análisis. Detectar la presencia de agregados plaquetarios dentro de la muestra es importante debido a la posibilidad de que los agregados se cuenten como WBC (y de este modo eleven falsamente el recuento de WBC) y/o causen un falso diagnóstico de trombocitopenia. Estos problemas potenciales son particularmente relevantes con los analizadores automatizados existentes. La presencia de agregados plaquetarios puede ser un indicador de mezcla inadecuada de la muestra con EDTA.

Una vez que se identifica un agregado plaquetario, pueden determinarse la intensidad de emisión fluorescente integrada del agregado y el área del agregado. El número de plaquetas dentro del agregado puede determinarse entonces dividiendo la intensidad de emisión fluorescente integrada por la intensidad de emisión de plaquetas promedio. El valor del cociente es una aproximación aceptable del número real de plaquetas dentro del agregado. Una aproximación del número de plaquetas dentro de un agregado también puede determinarse dividiendo el área del agregado por el área promedio de las plaquetas.

Aunque esta invención se ha mostrado y descrito con respecto las realizaciones detalladas de la misma, los expertos en la materia entenderán que diversos cambios de forma y detalle pueden realizarse sin alejarse del alcance de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Un método para enumerar plaquetas dentro de una muestra de sangre que tiene una pluralidad de plaquetas (42), que comprende las etapas de:

depositar la muestra en una cámara de análisis (10) adaptada para contener de forma quiescente la muestra para análisis, la cámara (10) definida por un primer panel (12) y un segundo panel (16), paneles (12, 16) que son, ambos, transparentes;
mezclar un colorante con la muestra, colorante que es operativo para hacer que las plaquetas (42) emitan fluorescencia tras la exposición a una o más primeras longitudes de onda de luz predeterminadas;
iluminar al menos una parte de la muestra que contiene las plaquetas (42) a las primeras longitudes de onda;
obtener imágenes de la al menos una parte de la muestra, incluyendo producir señales de imagen indicativas de emisiones fluorescentes desde las plaquetas (42), emisiones fluorescentes que tienen una intensidad;
identificar las plaquetas (42) por sus emisiones fluorescentes, usando las señales de imagen;
determinar un valor promedio de intensidad de emisión fluorescente para las plaquetas individuales (42) identificadas dentro de la muestra;
identificar agregados (48) de plaquetas dentro de la muestra usando una o más de sus emisiones fluorescentes, área, forma y granularidad;
enumerar plaquetas dentro de cada agregado plaquetario (48) usando el valor promedio de intensidad de emisión fluorescente determinado para las plaquetas individuales (42) dentro de la muestra.

2. El método de la reivindicación 1, en el que la muestra de sangre está sustancialmente sin diluir.

3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que la muestra de sangre es sangre completa.

4. El método de la reivindicación 1, 2 o 3 que comprende además la etapa de enumerar plaquetas que residen individualmente dentro de la muestra, y determinar un número total de plaquetas dentro de la muestra como una suma de las plaquetas dentro de cada agregado plaquetario (48) y las plaquetas (42) que residen individualmente dentro de la muestra.

5. El método de cualquier reivindicación anterior, que comprende además la etapa de identificar plaquetas gigantes (44) dentro de la muestra.

6. El método de la reivindicación 5, en el que las plaquetas gigantes (44) dentro de la muestra se identifican mediante una o más de emisiones fluorescentes, área y forma.

7. El método de la reivindicación 5 o 6, que comprende además la etapa de determinar el área de al menos una de las plaquetas gigantes (44) dentro de la muestra.

8. El método de la reivindicación 7, que comprende además la etapa de determinar un área promedio para las plaquetas individuales (42) identificadas dentro de la muestra, y comparar el área de la al menos una plaqueta gigante (44) con el área promedio de las plaquetas.

9. El método de la reivindicación 7, que comprende además la etapa de determinar un área promedio para las plaquetas individuales (42) identificadas dentro de la muestra y una desviación estadística de las áreas de las plaquetas individuales (42), y comparar el área de la al menos una plaqueta gigante (44) con el un valor basado en la desviación estadística de las áreas de las plaquetas individuales para identificar la al menos una plaqueta gigante (44).

10. El método de la reivindicación 7, que comprende además la etapa de comparar el área de la al menos una plaqueta gigante (44) con un valor predeterminado para identificar la al menos una plaqueta gigante (44).

11. El método de cualquier reivindicación anterior, que comprende además la etapa de determinar un área promedio para las plaquetas individuales (42) identificadas dentro de la muestra, en el que la etapa de enumerar plaquetas dentro de cada agregado plaquetario (48) incluye además usar el área promedio para las plaquetas individuales (42) dentro de la muestra.

12. El método de cualquier reivindicación anterior, que comprende además las etapas de:

iluminar la al menos una parte de la muestra que contiene las plaquetas (42) a una o más segundas longitudes de onda;
obtener imágenes de la al menos una parte de la muestra, incluyendo producir señales de imagen indicativas de una densidad óptica de uno o más constituyentes dentro de la muestra;
determinar la densidad óptica de los uno o más constituyentes dentro de la muestra, usando las señales de imagen;
y
distinguir las plaquetas (42) y los uno o más constituyentes entre sí usando la densidad óptica.

13. El método de cualquier reivindicación anterior, que comprende además la etapa de distinguir las plaquetas (42) de constituyentes dentro de la muestra que contienen hemoglobina iluminando la al menos una parte de la muestra con luz a una o más segundas longitudes de onda que son absorbidas por la hemoglobina.

5 14. Un aparato para enumerar plaquetas dentro de una muestra de sangre, que comprende: una cámara de análisis (10) adaptada para contener de forma quiescente la muestra para análisis, la cámara (10) definida por un primer panel (12) y un segundo panel (16), que son, ambos, transparentes, en el que una cantidad de colorante se dispone dentro de la cámara (10), colorante que es operativo para hacer que las plaquetas (42) emitan fluorescencia tras la exposición a una o más primeras longitudes de onda de luz predeterminadas;

10 iluminar al menos una parte de la muestra que contiene las plaquetas (42) a las primeras longitudes de onda; una unidad de imaginología que incluye un iluminador (56) y un disector de imágenes (58), unidad que es accionable para obtener imágenes de al menos una parte de la muestra y producir señales de imagen indicativas de emisiones fluorescentes procedentes de las plaquetas (42), emisiones fluorescentes que tienen una intensidad; y
15 un analizador programable (50) adaptado para identificar las plaquetas (42) por sus emisiones fluorescentes, usando las señales de imagen, y determinar un valor promedio de intensidad de emisión fluorescente para las plaquetas individuales (42) identificadas dentro de la muestra, e identificar agregados (48) de plaquetas dentro de la muestra usando una o más de sus emisiones fluorescentes, área, forma y granularidad, y enumerar plaquetas dentro de cada agregado plaquetario (48) usando el valor promedio de intensidad de emisión fluorescente determinado para las
20 plaquetas individuales (42) dentro de la muestra.

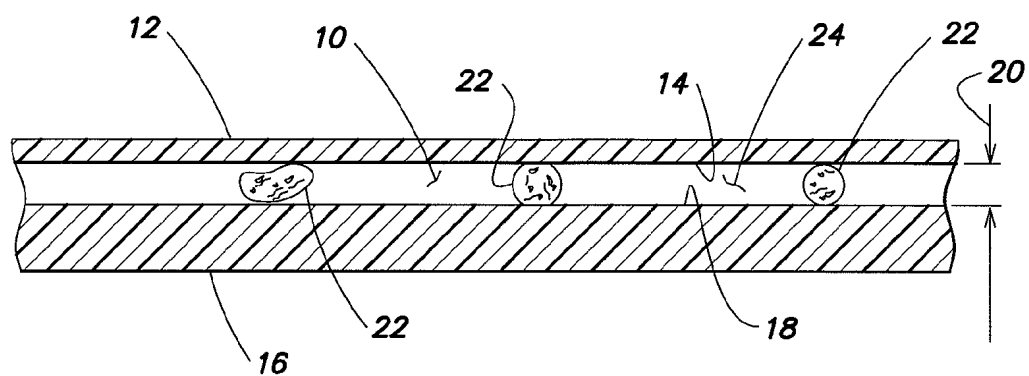


FIG. 1

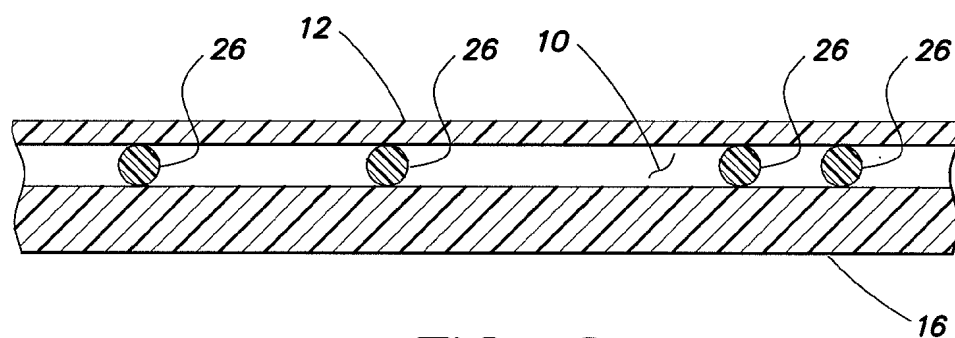


FIG. 2

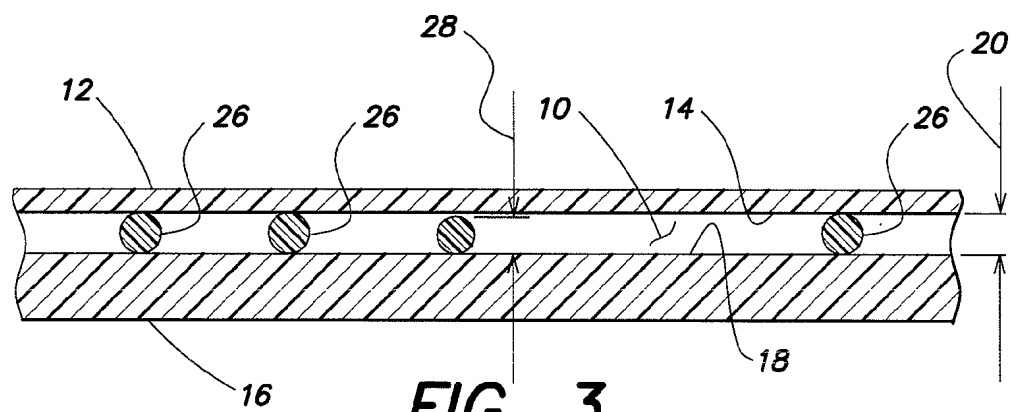


FIG. 3

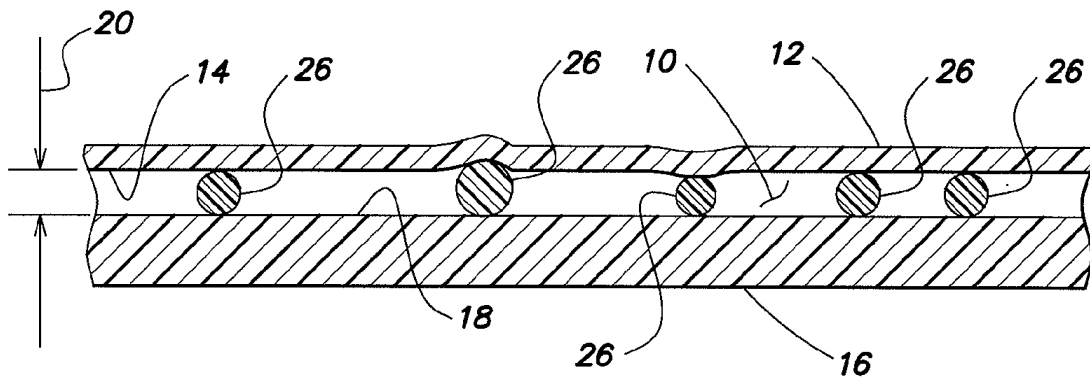


FIG. 4

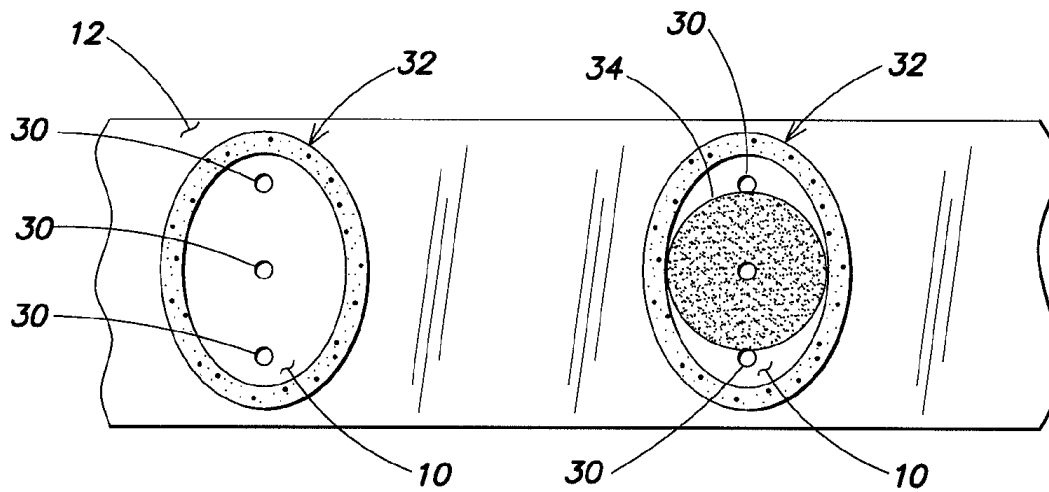


FIG. 5

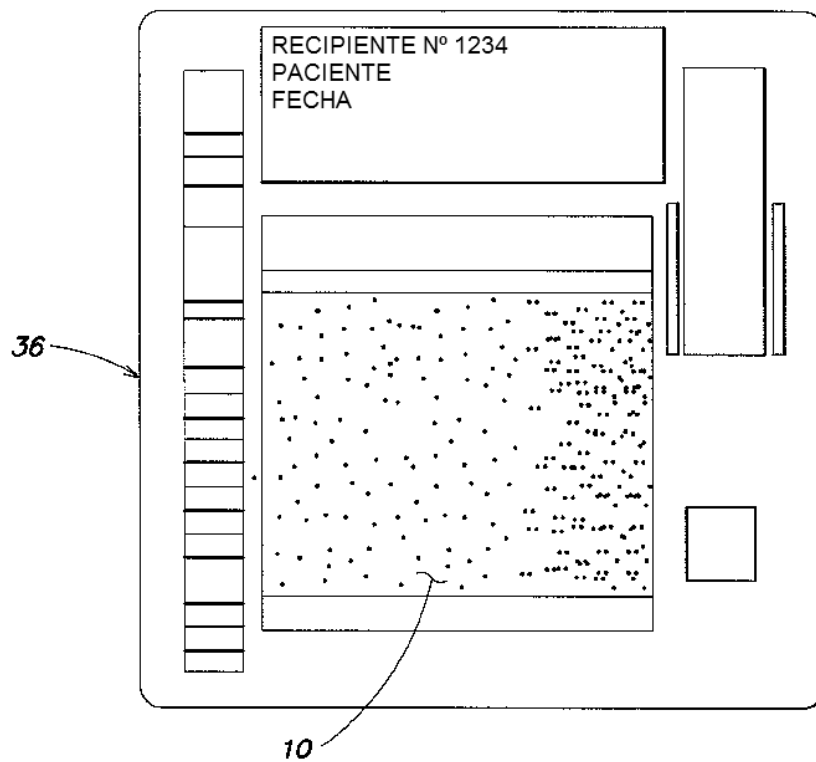


FIG. 6

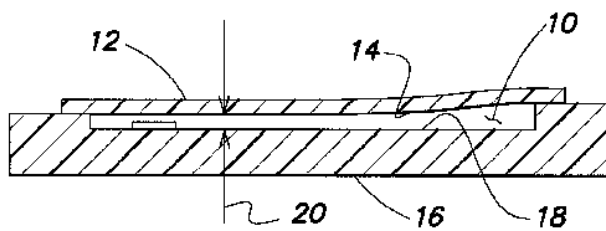


FIG. 7

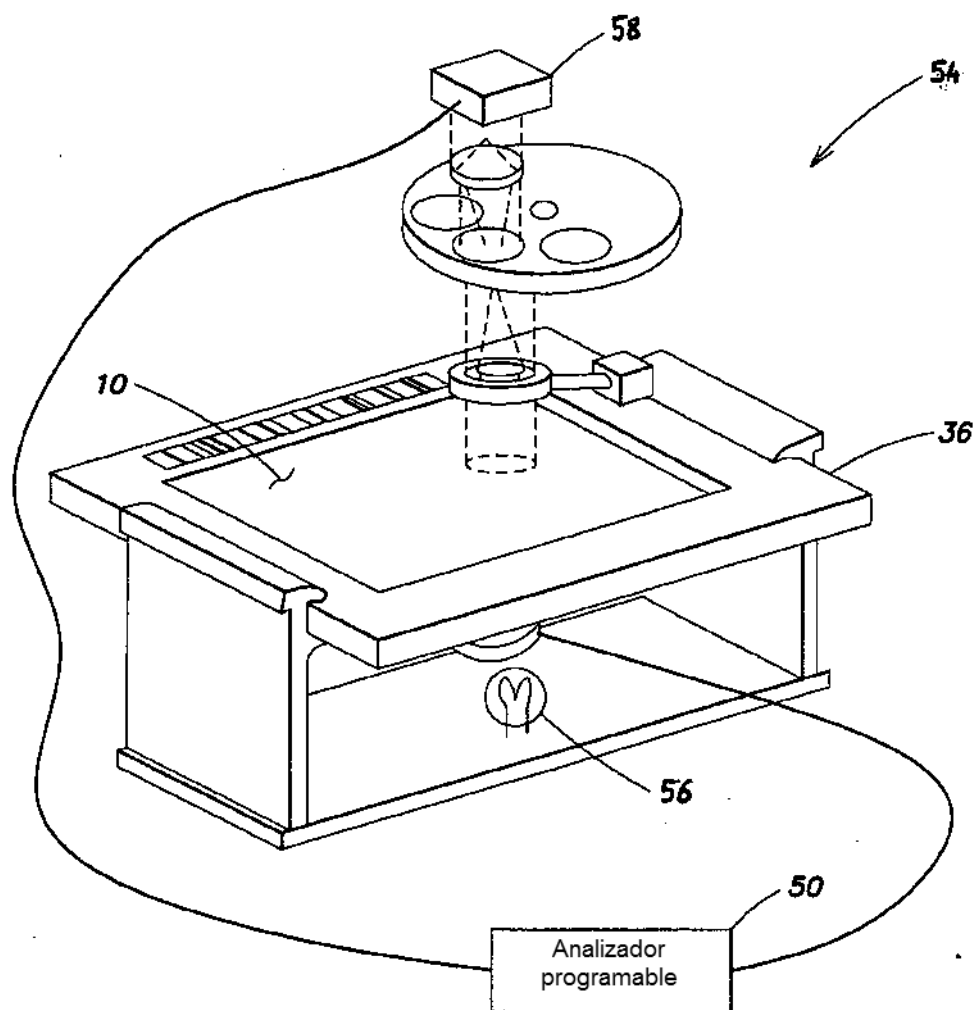
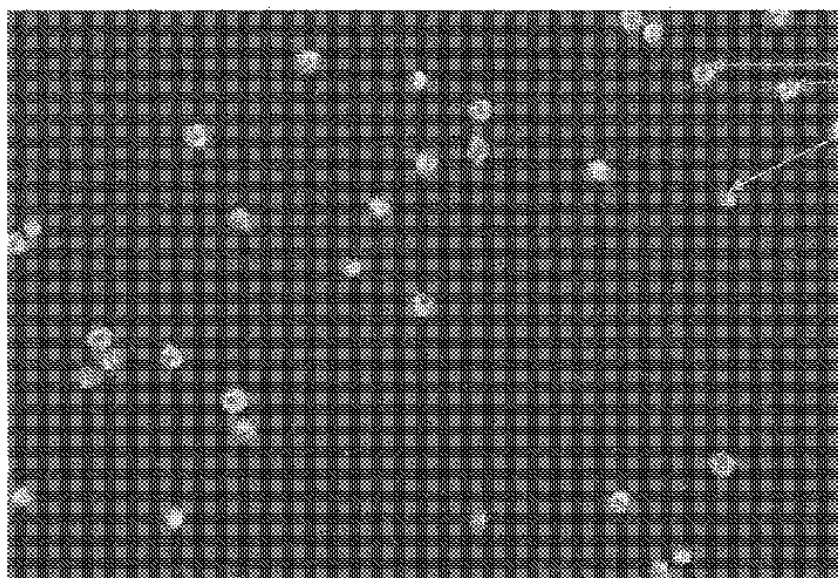
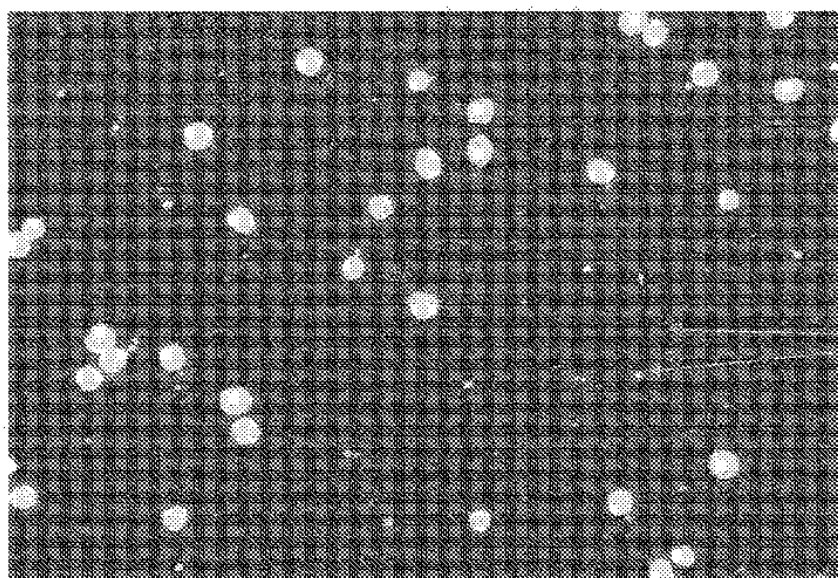


FIG. 8



40

FIG. 9



42

FIG. 10

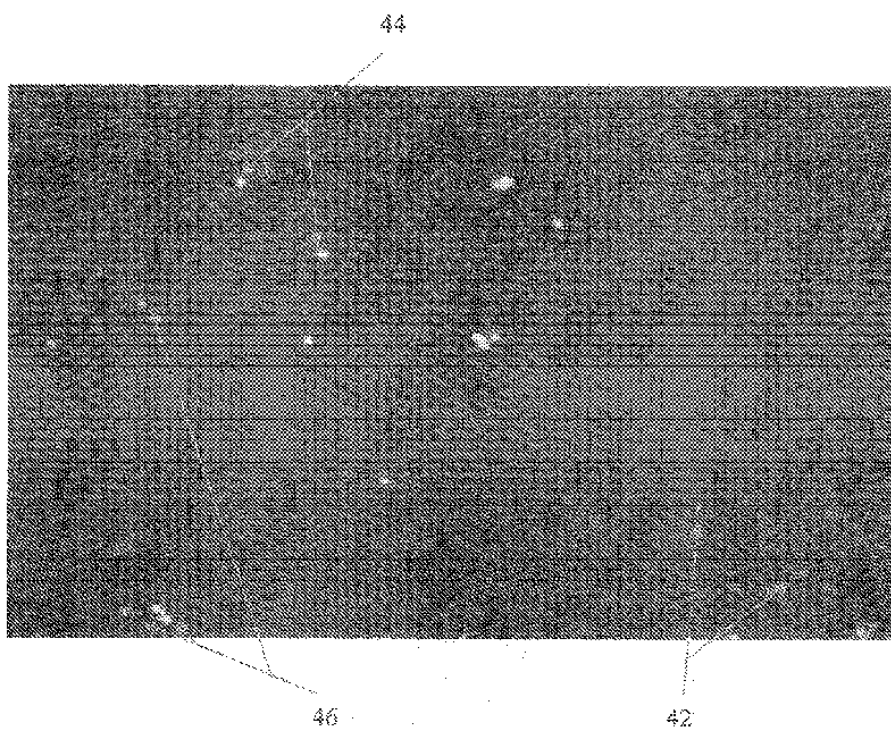


FIG. 12

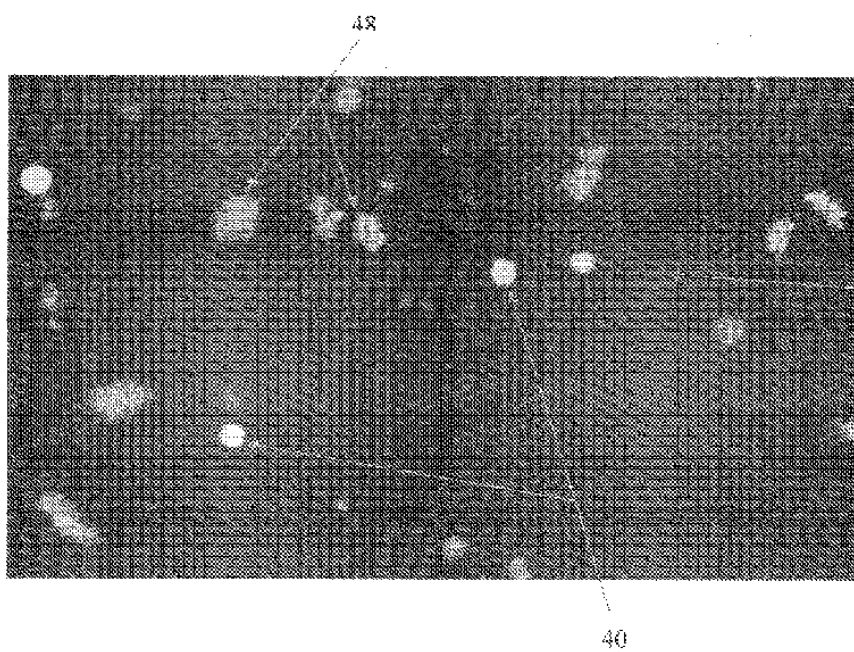


FIG. 11

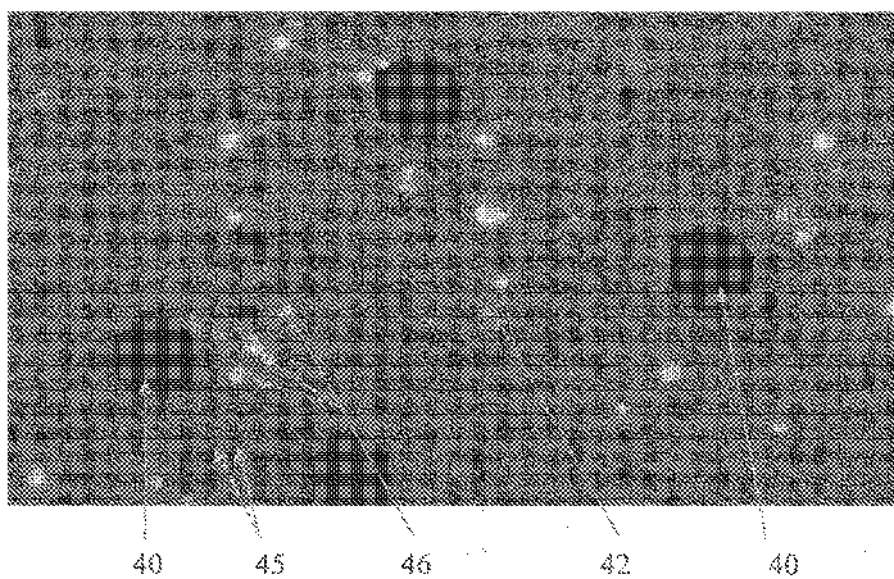


FIG. 13

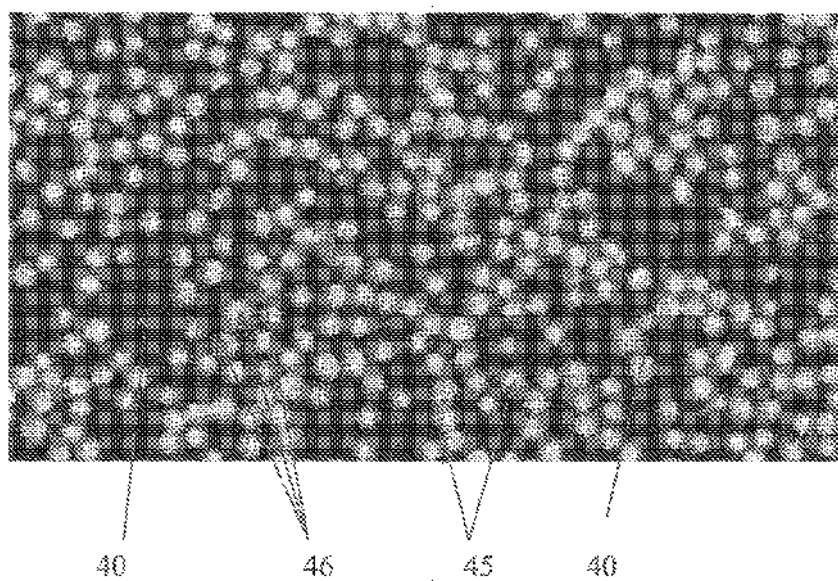


FIG. 14

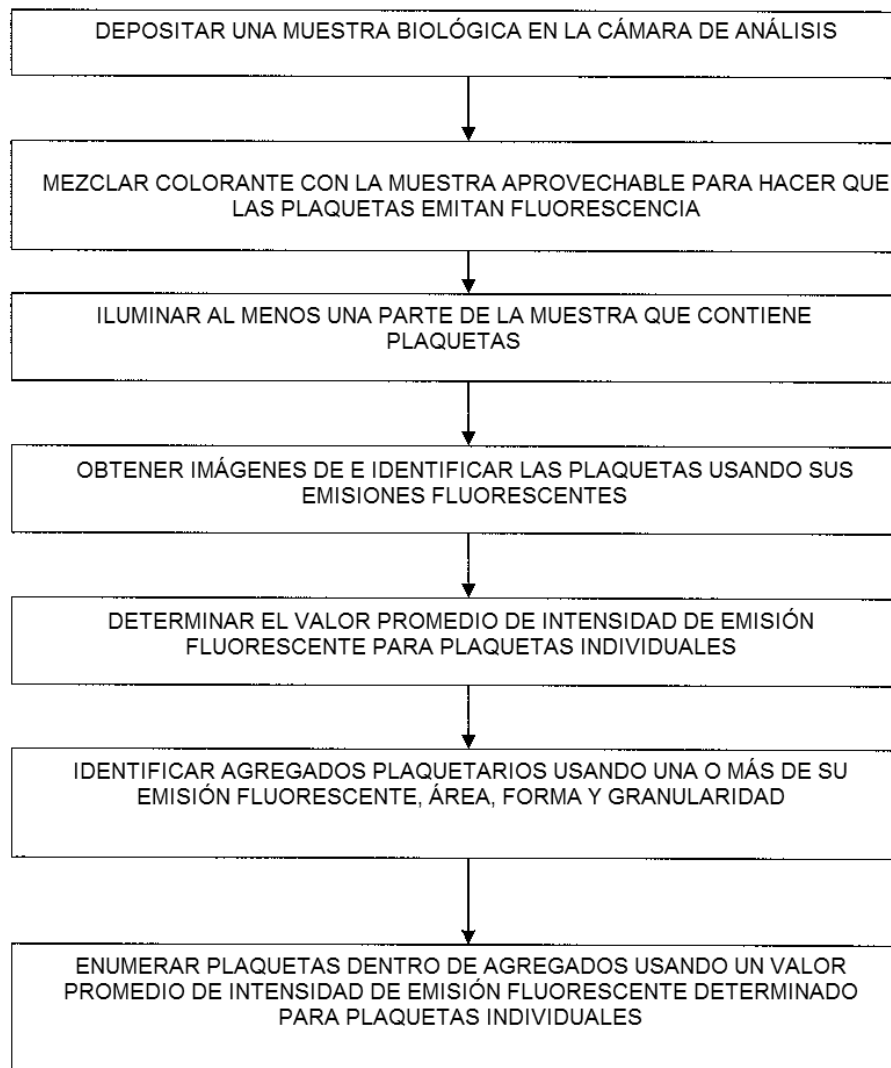


FIG. 15